

Device for preparing samples for detecting a nucleotide sequence

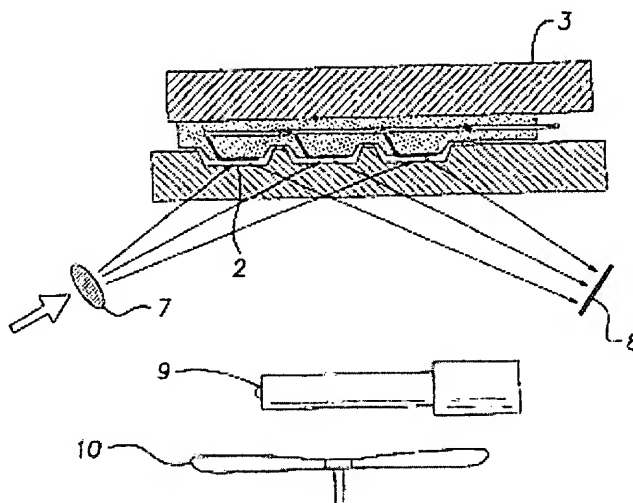
Patent number: DE19826153
Publication date: 1999-12-16
Inventor: BERTLING WOLF (DE)
Applicant: NOVEMBER AG NOVUS MEDICATUS BE (DE)
Classification:
- international: C12M1/34; C12Q1/32; C12Q1/68; G01N21/64; C12M1/18; C12M1/20
- european: C12Q1/68B10
Application number: DE19981026153 19980612
Priority number(s): DE19981026153 19980612

Also published as:

WO9964157 (A1)
EP1096998 (A1)
US6383802 (B1)
CA2334891 (A1)
EP1096998 (B1)

Abstract of DE19826153

The invention relates to a method for preparing samples for detecting a nucleotide sequence by polymerase chain reaction (PCR), according to which a) an analysis solution is filled into at least one cavity (2) provided for in a support (1); b) a lid (3) configured complementary to the shape of the cavity (2) is placed onto the support (1) in such a way that the analysis solution is pushed at least partly into a gap (S) formed between the cavity (2) and the lid (3); and c) the gap (S) is sealed by means of at least one seal (5, 12) provided for near an opening in the cavity (2).



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 198 26 153 A 1

51 Int. Cl. 6:
C 12 M 1/34
C 12 Q 1/32
C 12 Q 1/68
G 01 N 21/64
C 12 M 1/18
C 12 M 1/20

21 Aktenzeichen: 198 26 153.5
22 Anmeldetag: 12. 6. 98
43 Offenlegungstag: 16. 12. 99

DE 198 26 153 A 1

71 Anmelder:
November AG Novus Medicatus Bertling
Gesellschaft für Molekulare Medizin, 91056
Erlangen, DE
74 Vertreter:
Gaßner, W., Dr.-Ing., Pat.-Anw., 91052 Erlangen

72 Erfinder:
Bertling, Wolf, Prof. Dr., 91056 Erlangen, DE

56 Entgegenhaltungen:

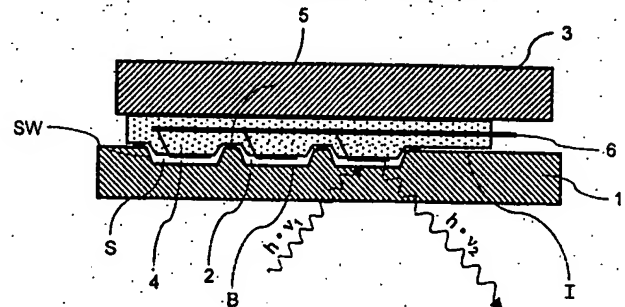
DE 195 19 015 C1
DE 1 967 46 505 A1
DE 33 36 738 A1
DE 430 16 93A 11
US 54 55 175
WO 97 12 063 A1
WO 96 41 864 A1
WO 93 20 240 A1

NORTHROP, M.A.: The 7th International Conference
on Solid-State Sensors and Actuators, 1992, 924-6;
GORUIK, E.: Science 280, 1998, 1544-5;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen
Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren und Vorrichtung zum Nachweis einer in einer Probe ggf. enthaltenen Nukleotidsequenz

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer in einer Probe ggf. enthaltenen Nukleotidsequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), wobei
a) eine Nachweislösung in mindestens eine an einem Träger 1 vorgesehene Kavität 2 gefüllt wird,
b) ein zur Form der Kavität 2 komplementär ausgebildeter Deckel 3 so auf den Träger 1 gesetzt wird, daß die Nachweislösung zumindest teilweise in einen zwischen der Kavität 2 und dem Deckel 3 gebildeten Spalt S verdrängt wird und
c) der Spalt S durch mindestens eine in der Nähe einer Öffnung der Kavität 2 vorgesehene Dichtung 5, 12 abgedichtet wird.



DE 198 26 153 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Nachweis einer in einer Probe ggf. enthaltenen Nukleotidsequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

Aus der US 5,455,175 ist ein sogenannter Thermocycler bekannt, mit dem eine Mehrzahl an flüssigen biologischen Proben zur Durchführung der PCR wiederkehrend einem vorgegebenen Temperaturprofil ausgesetzt werden kann. Um die erforderliche Zeit für die Temperaturbehandlung zu verkürzen, ist hier jeweils ein kleines Volumen der biologischen Proben in einer dünnwandigen Glaskapillare aufgenommen. Dazu muß jede Probe einzeln in die Kapillare abgefüllt und anschließend eingeschweißt werden. Das ist zeitaufwendig.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Insbesondere sollen ein Verfahren und eine Vorrichtung angegeben werden, mit denen bei der PCR der Zeitaufwand zur Probenvorbereitung verringert wird. Weiteres Ziel der Erfindung ist eine vereinfachte und verbesserte, insbesondere in Echtzeit erfolgende Detektion sowie eine Steigerung der Sensitivität.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 14 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 13 und 15 bis 43.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis einer in einer Probe ggf. enthaltenen Nukleotidsequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion vorgesehen, wobei

- a) eine Nachweislösung in mindestens eine an einem Träger vorgesehene Kavität gefüllt wird,
- b) ein zur Form der Kavität komplementär ausgebildeter Deckel so auf den Träger gesetzt wird, daß die Nachweislösung zumindest teilweise in einen zwischen der Kavität und dem Deckel gebildeten Spalt verdrängt wird und
- c) der Spalt durch mindestens eine in der Nähe einer Öffnung der Kavität vorgesehene Dichtung abgedichtet wird.

Mit dem vorgeschlagenen Verfahren wird die Zeit zur Probenvorbereitung erheblich verkürzt. Der Vorgang des Einschweißens der Probenlösung in eine Kapillare entfällt.

Der Nachweislösung kann ein erster und/oder zweiter Primer zugesetzt sein. Es wird als besonders vorteilhaft angesehen, daß ein dritter Primer, vorzugsweise mit seinen 5'-terminalen Ende, an die in die Kavität ragende Innenseite des Deckels gebunden ist. Auf diese Weise ist es möglich, eine ggf. in einer Probe enthaltene Nukleotidsequenz an den dritten Primer anzulagern. Das kann besonders einfach durch Eintauchen der Innenseite des Deckels in die Probe erreicht werden. Ferner kann die amplifizierte Nukleinsäure nach Abschluß der Amplifikationszyklen durch Binden an den dritten Primer an der Innenseite angereichert werden. Die Anreicherung wird zweckmäßigerweise durch Anlegen eines elektrischen Felds durchgeführt. Unter dem Einfluß eines elektrischen Felds wird die Nukleotidsequenz in Richtung des dritten Primers bewegt.

Zum Nachweis des Vorliegens der gesuchten Nukleotidsequenz wird zweckmäßigerweise die Nachweislösung und/oder einer der Primer auf deren Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Bei Anlagerung der nachzuweisenden Nukleotidsequenz an einen der Primer kann eine Veränderung der fluorogenen Eigenschaften der in der Nachweislösung befindlichen Stoffe erfolgen. Vorteilhafterweise ist bei Anlagerung der nachzuweisenden Nukleotidsequenz an einen der Primer eine räumliche Beziehung zwischen zwei fluorophoren Gruppen so änderbar, daß eine Fluoreszenzreaktion erzeugt-, änder- oder aufhebbar ist.

Nach einer weiteren Ausgestaltung wird die Nachweislösung zyklisch aufgeheizt und abgekühlt. Ein typischer Temperaturzyklus besteht aus einem ersten Aufheizen der Nachweislösung auf 90 bis 92°C, einem Abkühlen auf 50 bis 55°C sowie einem zweiten Aufheizen auf 72 bis 75°C. Während des ersten Aufheizens erfolgt eine Denaturierung, während des Abkühlens die Renaturierung und während des zweiten Aufheizens die Synthese der Nukleotidsequenz. Der vorgenannte Zyklus wird etwa 30 mal wiederholt.

Das Aufheizen kann mittels Licht, vorzugsweise Infrarotstrahlung, einer Widerstandsheizung oder durch Umspülen der Kavität mit einem Gas oder einer Flüssigkeit durchgeführt werden. Ein schnelles Abkühlen wird zweckmäßigerweise durch Umspülen der Kavität mit einem Gas, z. B. Luft, oder einer Flüssigkeit oder mittels eines Peltierelements durchgeführt.

Erfindungsgemäß ist ferner eine Vorrichtung zum Nachweis einer in einer Probe ggf. enthaltenen Nukleotidsequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion vorgesehen, mit

- a) einem Träger, mit mindestens einer Kavität,
- b) einem zur Kavität komplementär ausgebildeten Deckel, der so auf den Träger aufsetzbar ist, daß eine in der Kavität aufgenommenen Nachweislösung zumindest teilweise in einen zwischen der Kavität und dem Deckel gebildeten Spalt verdrängbar ist und
- c) einer in der Nähe einer Öffnung angeordneten Dichtung zum Abdichten des Spalts.

Die vorgeschlagene Vorrichtung erlaubt eine zeitsparende Probenvorbereitung.

Vorteilhafterweise ist eine Einrichtung zum zyklischen Aufheizen und Abkühlen der Nachweislösung vorgesehen. Ferner kann eine Einrichtung zum Untersuchen der Fluoreszenzeigenschaften der Nachweislösung und/oder einer der Primer vorgesehen sein.

Der Träger kann aus einem lichtdurchlässigen Material, vorzugsweise aus Glas oder Kunststoff, hergestellt sein. Die Kavität ist zweckmäßigerweise abschnittsweise planar ausgebildet; sie weist vorzugsweise einen ebenen Boden und eine konisch zur Öffnung sich erweiternde umlaufende Seitenwand auf. Auf dem Träger und/oder an der Innenseite des Deckels kann an zwischen den Kavitäten bzw. an der Innenseite des Deckels angeordneten Vorsprüngen befindlichen Abschnitten eine weitere Dichtung vorgesehen sein. Die weitere Dichtung kann ebenso wie die Dichtung z. B. aus Gummi, Silikon, Teflon oder anderen geeigneten Materialien hergestellt sein.

Es wird als besonders vorteilhaft angesehen, daß der Träger 96 Kavitäten und der Deckel 96 zur Form der Kavitäten komplementäre Vorsprünge aufweist. So kann der Träger beispielsweise in etwa die Dimension einer herkömmlichen 96-Napf-Mikrotiterplatte aufweisen. Selbstverständlich kann der Träger auch Bruchteile oder ein Vielfaches der vorgenannten Kavitätenanzahl aufweisen.

Nach einer weiteren Ausgestaltung kann der Deckel aus einem elektrisch leitfähigen Material, vorzugsweise aus einem Kunststoff, hergestellt sein. Der Träger kann eine, vorzugsweise aus Platin hergestellte Elektrode aufweisen, so daß zwischen dem Deckel und dem Träger ein elektrisches Feld angelegt werden kann, durch das in der Nachweislösung enthaltene Nukleotidsequenz auf die Innenseite bewegt und durch Feldinversionzyklen angereichert werden können.

Der Kunststoff kann ein Polycarbonat, ein Trimethylthiophen, Triaminobenzol und/oder ein Polycarbonat enthalten, und die Innenseite des Deckels kann zumindest abschnittsweise mit einer biomolekülbindenden Substanz ver-

sehen sein. Dabei kann die Bindung der Nukleotidsequenz zum Kunststoff durch Streptavidin oder Avidin vermittelt werden.

Der Nachweislösung ist vorteilhafterweise ein erster und/oder zweiter Primer zugesetzt. Als besonders vorteilhaft wird angesehen, daß an der der Kavität zugewandten Innenseite des Deckels ein dritter Primer, vorzugsweise mit einem 5'-terminalen Ende, gebunden ist. Das ermöglicht eine Entfernung der amplifizierten Nukleotidsequenz aus der Nachweislösung.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist ein zum Anregen von Fluoreszenz zwischen dem Boden und der Innenseite des Deckels dienendes Mittel vorgesehen. Vom Mittel zum Anregen stammende Strahlung kann auf die Innenseite des Deckels fokussierbar sein. Das ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die Nukleotidsequenz über den dritten Primer an die Innenseite gebunden ist. Das Mittel zum Anregen von Fluoreszenz wird zweckmäßigerweise von einer Laserdioden erzeugt. Es handelt sich in diesem Fall also um Laserlicht. Eine Anregung der Böden des Trägers kann auch durch einen sogenannten "gally-mode" Laser (Science, 1998, 280, p 1501, 1544 ff.) in einer vorgegebenen Weise gleichzeitig oder sukzessive erreicht werden.

Ferner können eine Einrichtung zur Detektion der Fluoreszenz, eine Einrichtung zur Auswertung der beobachteten Fluoreszenz und eine Einrichtung zum Bewegen des Trägers relativ zum Mittel zum Anregen der Fluoreszenz und/oder zur Einrichtung zur Detektion vorgesehen sein. Außerdem kann ein facettenaugenartiges Mittel zu separaten Anregung und/oder Detektion der Fluoreszenz zwischen jedem Boden und der Innenseite des dazugehörigen Deckels vorgesehen sein. Dadurch wird weiter Analysenzeit eingespart.

Der Deckel und/oder der Träger sind zweckmäßigerweise zumindest abschnittsweise schwarz gefärbt, so daß darauf abgestrahlte Wärme wirkungsvoll absorbiert wird. Sie bestehen insbesondere aus einem hoch wärmeleitfähigen Material.

Ferner kann eine Einrichtung zum zyklischen Aufheizen und Abkühlen der Nachweislösung vorgesehen sein, wobei zum Beheizen vorteilhafterweise ein Mittel zur Erzeugung von Licht, vorzugsweise Infrarotstrahlung, eine Widerstandsheizung oder ein Mittel zum Umspülen der Kavität mit einem Gas oder einer Flüssigkeit vorgesehen ist. Ferner ist zweckmäßigerweise ein Mittel zum Abkühlen vorgesehen, wobei die Abkühlung vorzugsweise durch Umspülen der Kavität mit einem Gas oder einer Flüssigkeit oder mittels eines Peltierelements erzielt wird.

Zur Verbesserung der Wärmeleitfähigkeit bei gleichzeitig guter Transparenz kann der Träger einen aus einem Glas hergestellten Boden aufweisen. Die Dichtung ist zweckmäßigerweise durch eine an der, vorzugsweise aus Kunststoff hergestellten, Seitenwand umlaufende Ausnehmung und einen dazu komplementären, am Vorsprung vorgesehenen umlaufenden, formschlüssig in die Ausnehmung einrastbaren Wulst gebildet. Die Dichtung ist zweckmäßigerweise bei einem Druckanstieg in der Kavität, z. B. durch Temperaturerhöhung, selbstabdichtend, indem der Wulst gegen die Ausnehmung gedrückt wird. Das Aufbringen oder Abheben des Deckel läßt sich durch eine hohe Flexibilität der zwischen den Vorsprüngen liegenden Abschnitte durch leichtes Biegen besonders einfach bewerkstelligen.

Schließlich wird ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens beansprucht, mit

- a) einem Träger mit mindestens einer Kavität und
- b) einem zur Kavität komplementär ausgebildeten Deckel, der so auf den Träger aufsetzbar ist, daß eine in der Kavität aufgenommene Nachweislösung zumindest

teilweise in einen zwischen der Kavität und dem Deckel gebildeten Spalt verdrängbar ist und

c) eine mindestens einen ersten Primer enthaltenden Nachweislösung.

Die Nachweislösung kann einen zweiten Primer enthalten. Ein dritter Primer kann, vorzugsweise mit seinem 5'-terminalen Ende, an eine der Kavität zugewandte Innenseite des Deckels gebunden sein.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Querschnittsansicht durch eine erste Vorrichtung,

Fig. 2 die Vorrichtung gemäß Fig. 1 bei Anregung und Detektion,

Fig. 3 eine schematische Querschnittsansicht einer zweiten Vorrichtung bei Anregung und Detektion,

Fig. 3a eine schematische Querschnittsansicht der Vorrichtung gemäß Fig. 3,

Fig. 4 eine schematische Teilquerschnittsansicht einer dritten Vorrichtung,

Fig. 5 eine schematische Querschnittsansicht einer Dichtung und

Fig. 6 die Querschnittsansicht nach Fig. 5 im nicht eingearbeiteten Zustand.

In Fig. 1 weist ein Träger 1 mehrere Kavitäten 2 auf. Ein Deckel 3 ist an seiner Innenseite I mit mehreren Vorsprüngen 4 versehen. Die Vorsprünge 4 weisen eine zur Kavität 2 komplementäre Form auf. Zwischen einem Boden B der Kavität 2 und dem parallel verlaufenden gegenüberliegenden Vorsprung 4 ist ein Spalt S gebildet. Die Kavität 2 ist des weiteren durch eine sich vom Boden B zur Öffnung der Kavität 2 hin konisch öffnende umlaufende Seitenwand SW begrenzt. Der zwischen dem Vorsprung 4 und der Kavität 2 gebildete Spalt S weist eine Breite von höchstens 1 mm auf. In der Nähe der Öffnung der Kavität 2 ist eine Dichtung 5 vorgesehen. Mit 6 ist eine im Deckel 3 eingegossene Elektrode bezeichnet. Der Träger 1 kann eine (hier nicht dargestellte) Gegenelektrode aufweisen.

In Fig. 2 ist die Vorrichtung nach Fig. 1 bei der Anregung und Detektion gezeigt. Mit 7 ist schematisch eine optische Einrichtung zum Anregen der im Spalt S aufgenommenen Nachweislösung bezeichnet. Dabei handelt es sich um ein facettenaugenartiges Mittel, mit dem mehrere oder alle Kavitäten 2 gleichzeitig z. B. mit Laserlicht beaufschlagt werden können. Die optische Einrichtung 7 ist auf die dem Boden B gegenüberliegende Innenseite I des Deckels 3 fokussiert. Mit 8 ist ein Fluorometer bezeichnet. Auch das Fluorometer 8 kann mit einem facettenaugenartigen Mittel versehen sein, so daß die von mehreren oder allen Kavitäten 2 ausgehende Fluoreszenz nachweisbar ist. Gegenüber dem Träger 1 befinden sich eine Infrarotstrahlungsquelle 9 sowie ein Ventilator 10.

Die Fig. 3 und 3a zeigen eine zweite Vorrichtung im schematischen Querschnitt. Dabei ist die Infrarotstrahlungsquelle 9 gegenüber dem Deckel 3 angeordnet. Der Deckel 3 ist aus einem schwarzen Material hoher Wärmeleitfähigkeit, z. B. einem Glas oder Metall, hergestellt. Zur besseren Absorption ist der Deckel 3 auf der der Innenseite I gegenüberliegenden Außenseite A mit einer schwarzen Farbe beschichtet. Die erste Dichtung 5 ist als selbstabdichtende Rastverbindung ausgebildet. Eine zweite Dichtung 12 in der Nähe des Öffnungsrandes der Kavität 2 besteht aus Gummi oder elastischem Kunststoff. Sie ist zwischen der Innenseite I des Deckels 3 und einer Oberseite O des Trägers 1 vorgesehen. Eine in der Kavität 2 aufgenommene Nachweislösung ist bei geschlossenem Deckel 3 in einen zwischen der Seitenwand SW und einer gegenüberliegenden Mantelflä-

che MF des Vorsprungs 4 befindlichen Spaltabschnitt SA verdrängt.

Auch in Fig. 4 ist der Träger 1 komplementär zum Deckel 3 geformt. Er ist ebenfalls aus einem Material hoher Wärmeleitfähigkeit hergestellt. Der Boden B ist aus einem transparenten Material, z. B. einem Glasfenster 11, gebildet.

In Fig. 5 ist in einer schematischen Teilquerschnittsansicht durch die erste Dichtung 5 gezeigt. Dabei greift ein an der Mantelfläche MF des Vorsprungs 4 vorgesehener umlaufender Wulst 13 im geschlossenen Zustand form- und kraftschlüssig in eine an der Seitenwand SW vorgesehene umlaufende Ausnehmung 14 ein. Fig. 6 zeigt die erste Dichtung 5 im noch nicht formschlüssig eingerasteten Zustand.

Die Funktion der Vorrichtung ist folgende:

Zur Probenvorbereitung wird Nachweislösung in die Kavität 2 des Trägers 1 pipettiert. Der Pipettiervorgang kann beispielsweise mittels eines Pipettierroboters erfolgen. Bei der Nachweislösung handelt es sich vorzugsweise um einen sogenannten Mastermix, in dem alle erforderlichen Reagenzien zur Durchführung der PCR enthalten sind. Insbesondere sind ein erster und ein zweiter Primer in der Nachweislösung enthalten. An der Innenseite I des Deckels 3 ist im Bereich der Vorsprünge 4 ein dritter Primer gebunden. An den dritten Primer ist die nachzuweisende Nukleotidsequenz angelagert. Die Anlagerung kann z. B. dadurch erfolgen, daß der Deckel 3 zuvor in eine die nachzuweisende Nukleotidsequenz enthaltende Probenlösung getaucht wird.

Zur Probenvorbereitung muß nun der Deckel 3 lediglich auf den Träger 1 so aufgesetzt werden, daß die Vorsprünge 4 in die komplementären Kavitäten 2 eintauchen. Dabei kommt der dritte Primer mit der angelagerten Nukleotidsequenz in Kontakt mit der Nachweislösung. Der Deckel 3 wird mit dem Träger 1 dichtend verschlossen, z. B. indem die an den Vorsprünge 4 vorgesehenen Wülste 13 in die komplementären Ausnehmungen 14 der Kavitäten 2 einrasten. In diesem Zustand wird ein Teil der Nachweislösung in den Spalt S verdrängt.

Anschließend wird insbesondere der zwischen der Innenseite I und dem Boden B gebildeter Spalt S der zur Durchführung der PCR erforderlichen Temperaturbehandlung unterzogen. Danach oder auch zwischen jedem Temperaturzyklus wird der zwischen Innenseite I und Boden B befindliche Bereich jeder Kavität 2 mittels der optischen Einrichtung 7 angeregt und dann unter Verwendung des Fluorometers 8 auf Fluoreszenz untersucht. Eine Fluoreszenzänderung zeigt das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein der gesuchten Nukleotidsequenz an.

Die Temperaturzyklen werden durch wiederkehrendes Aktivieren bzw. Deaktivieren der IR-Strahlungsquelle 9 bzw. des Ventilators 10 hervorgerufen.

Bezugszeichenliste

1 Träger	
2 Kavität	
3 Deckel	
4 Vorsprung	
5 erste Dichtung	
6 Elektrode	
7 optische Einrichtung	
8 Fluorometer	
9 IR-Strahlungsquelle	
10 Ventilator	
11 Glasfenster	
12 zweite Dichtung	
13 Wulst	
14 Ausnehmung	
I Innenseite	

B Boden	
SW Seitenwand	
S Spalt	
A Außenseite	
O Oberseite	
MF Mantelfläche	
SA Spaltabschnitt	

Patentansprüche

- Verfahren zum Nachweis einer in einer Probe ggf. enthaltenen Nukleotidsequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), wobei
 - eine Nachweislösung in mindestens eine an einem Träger (1) vorgesehene Kavität (2) gefüllt wird,
 - ein zur Form der Kavität (2) komplementär ausgebildeter Deckel (3) so auf den Träger (1) gesetzt wird, daß die Nachweislösung zumindest teilweise in einen zwischen der Kavität (2) und dem Deckel (3) gebildeten Spalt (S) verdrängt wird und
 - der Spalt (S) durch mindestens eine in der Nähe einer Öffnung der Kavität (2) vorgesehene Dichtung (5, 12) abgedichtet wird.
- Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Nachweislösung ein erster Primer zugesetzt wird.
- Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Nachweislösung ein zweiter Primer zugesetzt wird.
- Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein dritter Primer, vorzugsweise mit seinem 5'-terminalen Ende, an die in die Kavität (2) ragende Innenseite (I) des Deckels (3) gebunden ist.
- Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in der Probe ggf. enthaltene Nukleotidsequenz an den dritten Primer angelagert ist.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 4 oder 5, wobei amplifizierte Nukleinsäure nach Abschluß der Amplifikationszyklen durch Binden an den dritten Primer an der Innenseite (I) angereichert wird.
- Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Anreicherung durch Anlegen eines elektrischen Felds durchgeführt wird.
- Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nachweislösung und/oder einer der Primer auf deren Fluoreszenzeigenschaften untersucht wird/werden.
- Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Anlagerung der nachzuweisenden Nukleotidsequenz an einen der Primer eine Veränderung der fluorogenen Eigenschaften der in der Nachweislösung befindlichen Stoffe erfolgt.
- Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Anlagerung der nachzuweisenden Nukleotidsequenz an einen der Primer eine räumliche Beziehung zwischen zwei fluorophoren Gruppen so geändert wird, daß eine Fluoreszenzreaktion erzeugt, -änder- oder aufhebbar ist.
- Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nachweislösung zyklisch aufgeheizt und abgekühlt wird.
- Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Aufheizen mittels Licht, vorzugsweise Infrarotstrahlung, einer Widerstandsheizung oder durch Umspülen der Kavität (2) mit einem Gas oder einer Flüssigkeit durchgeführt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei das Abkühlen durch Umspülen der Kavität mit einem Gas oder einer Flüssigkeit oder mittels eines Peltierelements durchgeführt wird.

14. Vorrichtung zum Nachweis einer in einer Probe ggf. enthaltenen Nukleotidsequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit

- a) einem Träger (1) mit mindestens einer Kavität (2),
- b) einem zur Kavität (2) komplementär ausgebildeten Deckel (3), der so auf den Träger (1) aufsetzbar ist, daß eine in der Kavität (2) aufgenommene Nachweislösung zumindest teilweise in einen zwischen der Kavität (2) und dem Deckel (3) gebildeten Spalt (S) verdrängbar ist und
- c) einer in der Nähe einer Öffnung der Kavität (2) angeordneten Dichtung (5, 12) zum Abdichten des Spalts (S).

15. Vorrichtung nach Anspruch 14, wobei eine Einrichtung zum zyklischen Aufheizen und Abkühlen der Nachweislösung vorgesehen ist.

16. Vorrichtung nach Anspruch 14 oder 15, wobei eine Einrichtung zum Untersuchen der Fluoreszenzeigenschaften der Nachweislösung und/oder einer der Primer vorgesehen ist.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei der Träger aus einem lichtdurchlässigen Material, vorzugsweise aus Glas oder Kunststoff, hergestellt ist.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 17, wobei die Kavität (2) abschnittsweise planar ausgebildet ist, vorzugsweise einen ebenen Boden (B) und eine konisch zur Öffnung sich erweiternde umlaufende Seitenwand (SW) aufweist.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 18, wobei auf dem Träger (1) und/oder an der Innenseite (I) des Deckels (3) in zwischen den Kavitäten (2) bzw. an der Innenseite (I) des Deckels (3) vorgesehenen Vorsprüngen (4) befindlichen Abschnitten eine weitere Dichtung (12) vorgesehen ist.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 19, wobei der Träger 96 Kavitäten (2) und der Deckel (3) 96 zur Form der Kavitäten (2) komplementäre Vorsprünge (4) aufweisen.

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 20, wobei der Deckel (3) aus einem elektrisch leitfähigen Material, vorzugsweise einem Kunststoff, hergestellt ist.

22. Vorrichtung nach Anspruch 21, wobei der Kunststoff ein Polycarbonat, Trimethylthiophen, Triaminobenzol und/oder ein Polycarbonat enthält und die Innenseite (I) des Deckels (3) zumindest abschnittsweise mit einer biomolekülbindenden Substanz versehen ist.

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 22, wobei der Träger (1) eine, vorzugsweise aus Platin hergestellte Elektrode aufweist, so daß ein elektrisches Feld angelegt werden kann, durch das in der Nachweislösung enthaltene Nukleotidsequenz auf die Innenseite (I) bewegt und durch Feldinversionszyklen angereichert werden können.

24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 23, wobei der Nachweislösung ein erster Primer zugesetzt ist.

25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 24, wobei der Nachweislösung ein zweiter Primer zugesetzt ist.

26. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 14 bis 25, wobei an der der Kavität (2) zuge-

wandten Innenseite (I) des Deckels (3) ein dritter Primer, vorzugsweise mit seinem 5'-terminalen Ende, gebunden ist.

27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 26, wobei ein zum Anregen von Fluoreszenz zwischen Boden (B) und der Innenseite (I) des Deckels (3) dienendes Mittel vorgesehen ist.

28. Vorrichtung nach Anspruch 27, wobei vom Mittel zum Anregen stammende Strahlung auf die Innenseite (I) des Deckels (3) fokussierbar ist.

29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 27 oder 28, wobei das Mittel (7) zum Anregen von Fluoreszenz von einer Laserdioden erzeugt wird.

30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 29, wobei eine Einrichtung (8) zur Detektion der Fluoreszenz vorgesehen ist.

31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 30, wobei eine Einrichtung zur Auswertung der beobachteten Fluoreszenz vorgesehen ist.

32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 29, wobei eine Einrichtung zum Bewegen des Trägers (1) relativ zum Mittel (7) zum Anregen von Fluoreszenz und/oder zur Einrichtung (8) zur Detektion vorgesehen ist.

33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 32, wobei ein facettenaugenartiges Mittel zur separaten Anregung und/oder Detektion der Fluoreszenz zwischen jedem Boden (B) und der Innenseite (I) des dazugehörigen Deckels (3) vorgesehen ist.

34. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 33, wobei der Deckel (3) und/oder der Träger (1) zumindest abschnittsweise schwarz gefärbt ist, so daß darauf abgestrahlte Wärme wirkungsvoll absorbiert wird.

35. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 34, wobei eine Einrichtung zum zyklischen Aufheizen und Abkühlen der Nachweislösung vorgesehen ist.

36. Vorrichtung nach Anspruch 35, wobei zum Beheizen ein Mittel (9) zur Erzeugung von Licht, vorzugsweise Infrarotstrahlung, eine Widerstandsheizung oder ein Mittel zum Umspülen der Kavität (2) mit einem Gas oder einer Flüssigkeit vorgesehen ist.

37. Vorrichtung nach Anspruch 35 oder 36, wobei ein Mittel (10) zum Abkühlen, vorzugsweise durch Umspülen der Kavität (2) mit einem Gas oder einer Flüssigkeit oder mittels eines Peltierelements, vorgesehen ist.

38. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 37, wobei der Träger (1) einen aus Glas hergestellten Boden (B) aufweist.

39. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 37, wobei die Dichtung (5) durch eine an der Seitenwand (SW) umlaufende Ausnehmung (14) und einen dazu komplementären, am Vorsprung (4) vorgesehenen umlaufenden, formschlüssig in die Ausnehmung (14) einrastbaren Wulst (13) gebildet ist.

40. Vorrichtung nach Anspruch 40, wobei die Dichtung (5) bei einem Druckanstieg in der Kavität (2) selbstabdichtend ist, indem der Wulst (13) gegen die Ausnehmung (14) gedrückt wird.

41. Kit zur Durchführung der Verfahrens nach Anspruch 1 mit

- a) einem Träger (1) mit mindestens einer Kavität (2) und
- b) einem zur Kavität (2) komplementär ausgebildeten Deckel (3), der so auf den Träger (1) aufsetzbar ist, daß eine in der Kavität (2) aufgenommene Nachweislösung zumindest teilweise in einen zwischen der Kavität (2) und dem Deckel (3)

gebildeten Spalt (S) verdrängbar ist,
c) eine mindestens einen ersten Primer enthaltende Nachweislösung.

42. Kit nach Anspruch 41, wobei die Nachweislösung einen zweiten Primer enthält.

43. Kit nach Anspruch 41 oder 42, wobei ein dritter Primer, vorzugsweise mit seinem 5'-terminalen Ende, an eine der Kavität (2) zugewandte Innenseite (1) des Deckels (3) gebunden ist.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

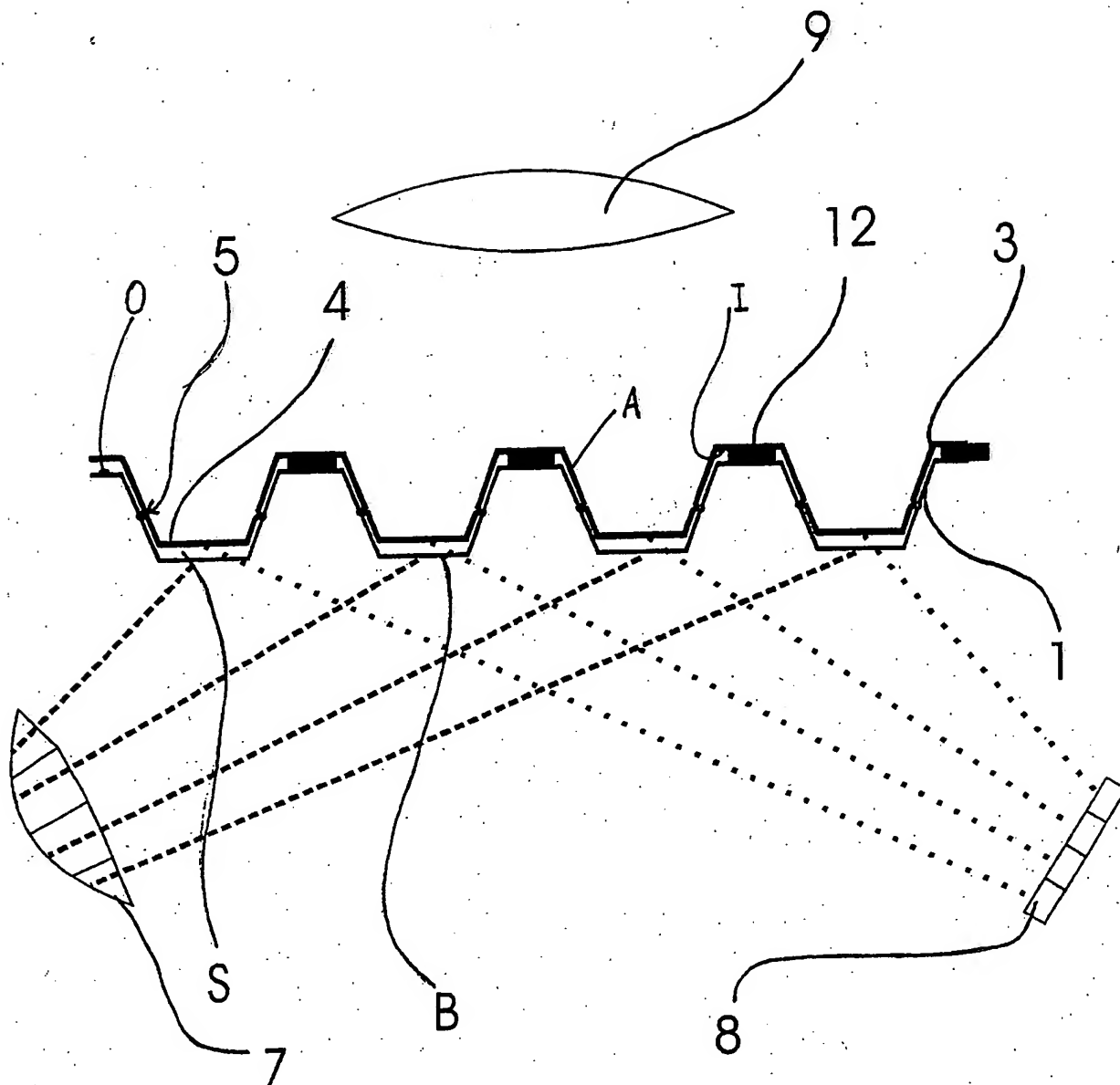


Fig. 3

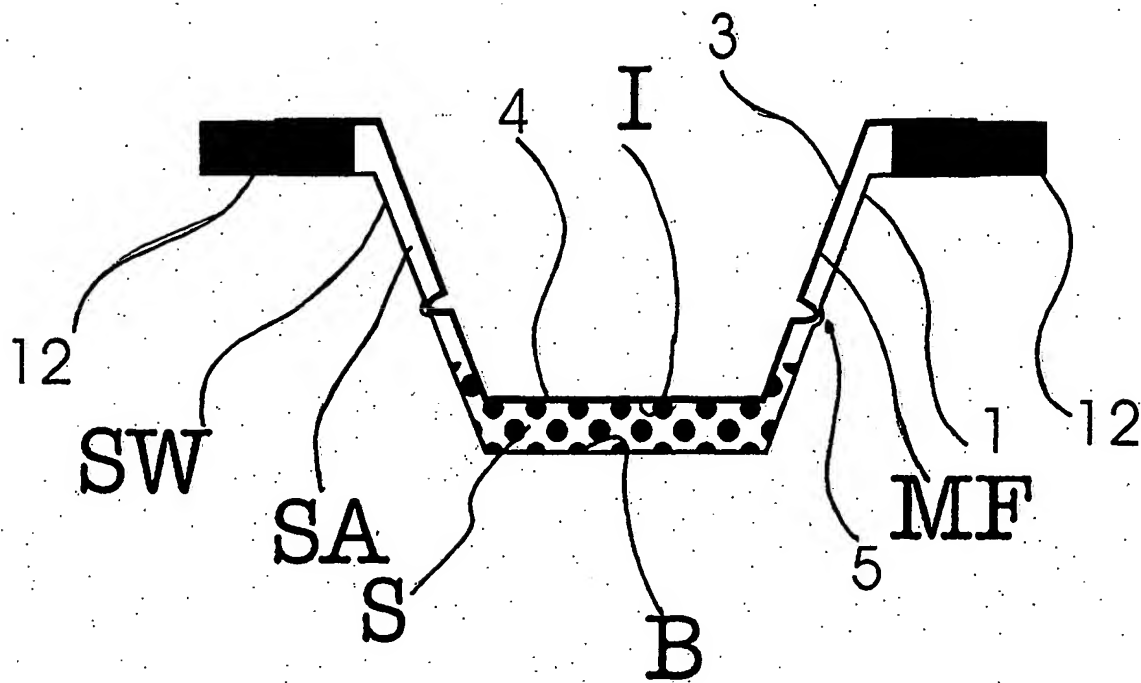


Fig. 3a

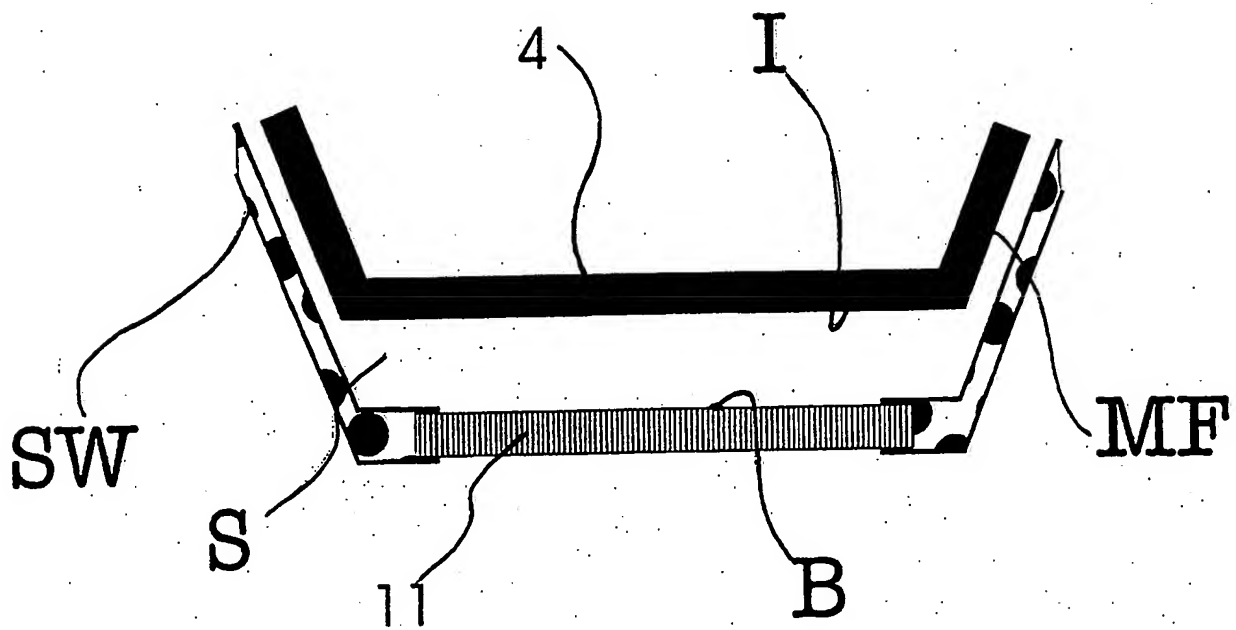


Fig. 4

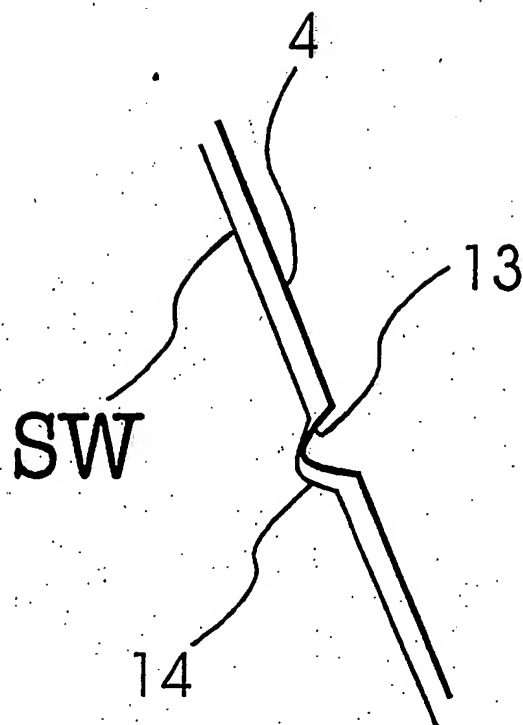


Fig. 5

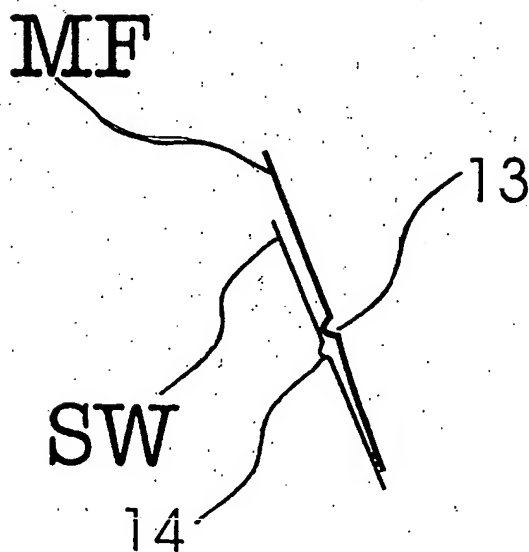


Fig. 6

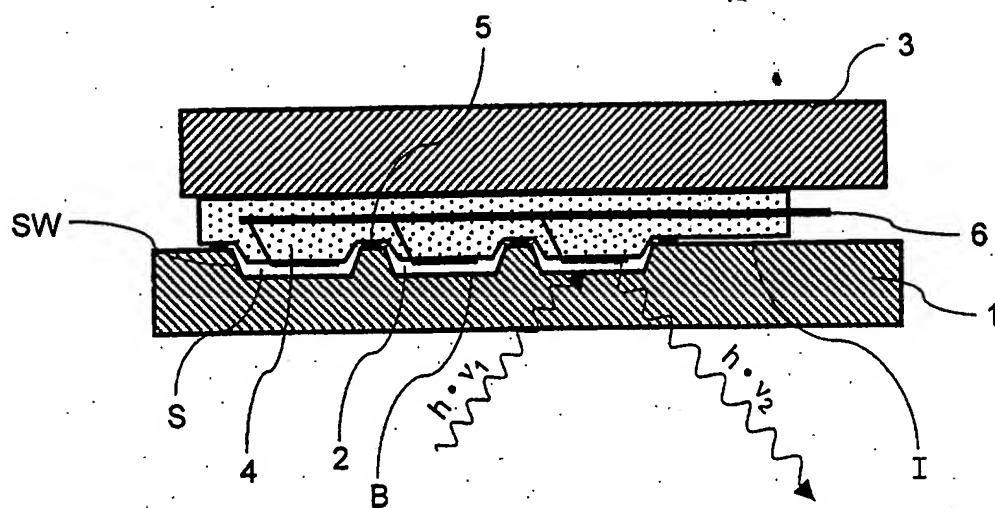


Fig. 1

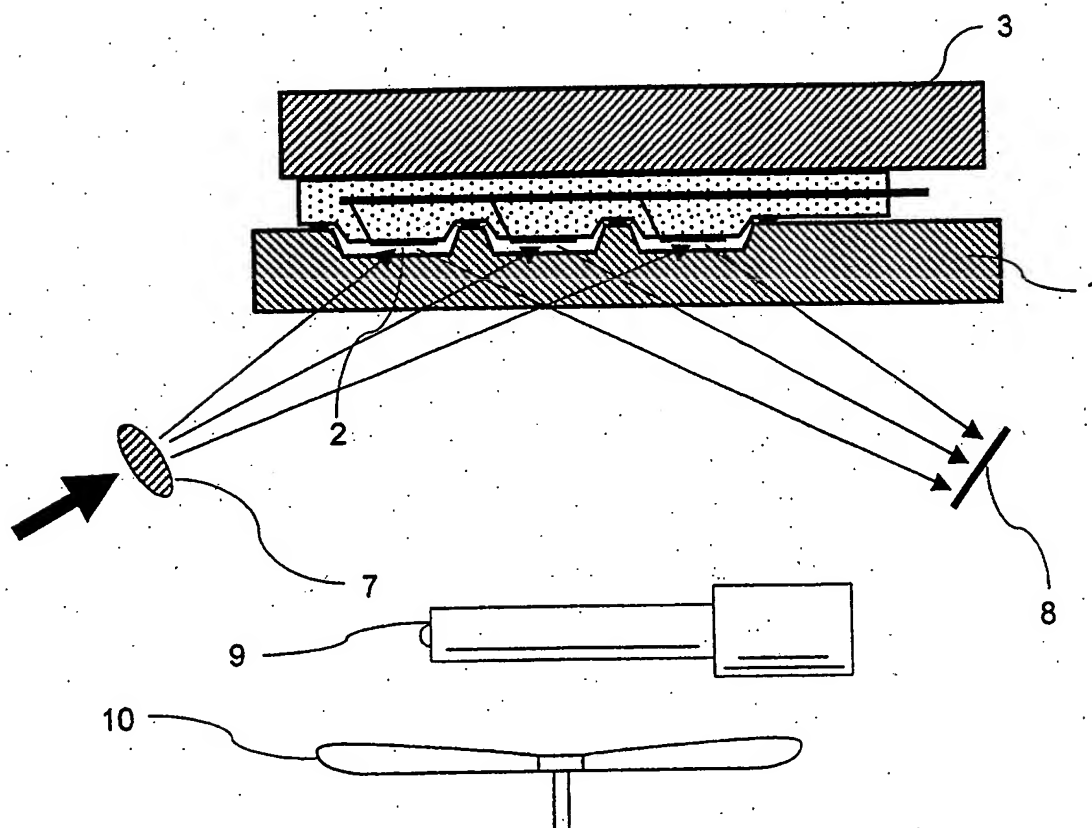


Fig. 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.